

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : G01N 27/327, 33/543, C12Q 1/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/16082 (43) Date de publication internationale: 23 mars 2000 (23.03.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02191</p> <p>(22) Date de dépôt international: 15 septembre 1999 (15.09.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/11561 16 septembre 1998 (16.09.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): CAILLAT, Patrice [FR/FR]; 10, rue de Provence, F-38130 Echirolles (FR). ROSILIO, Charles [FR/FR]; 16, allée de la Pommeraie, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR).</p> <p>(74) Mandataire: DES TERMES, Monique; Brevatome, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>	

(54) Title: DEVICE COMPRISING A PLURALITY OF ANALYSIS SITES ON A SUPPORT

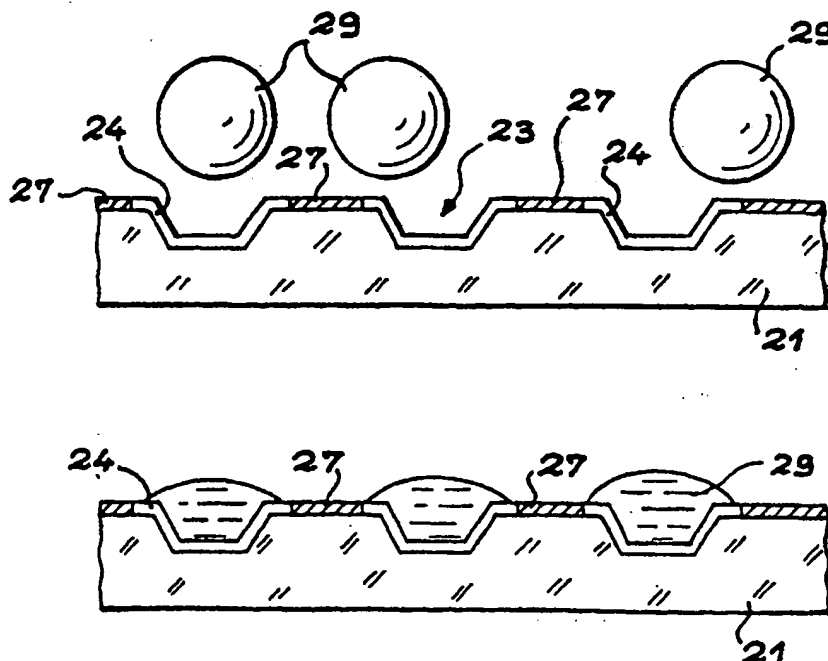
(54) Titre: DISPOSITIF COMPRENANT UNE PLURALITE DE SITES D'ANALYSE SUR UN SUPPORT

(57) Abstract

The invention concerns a device for chemical or biological analysis comprising a support (21) including a plurality of sites for fixing a chemical or biological reagent, wherein the analysis sites are formed by microwells (23) lying recessed in the support, the side walls and the base of said microwells and the support surface zones enclosing each microwell, called microwell rims, being produced in at least a hydrophilic material (24), and the support planar zones arranged between the zones enclosing the microwells being produced in a hydrophobic material (27). The drops (29) of reagent are thus guided into the microwells (23) owing to the presence of the hydrophobic zones (27), thereby increasing the number of analysis sites on the support.

(57) Abrégé

L'invention a pour objet un dispositif d'analyse chimique ou biologique comprenant un support (21) comportant une pluralité de sites d'analyse aptes à fixer un réactif chimique ou biologique, dans lequel les sites d'analyse sont constitués par des microcuvettes (23) s'étendant en creux dans le support, les parois latérales et le fond des microcuvettes et les zones de la surface du support entourant chaque microcuvette, dénommées bords de microcuvettes, étant réalisées en au moins un matériau hydrophile (24), et les zones planes du support disposées entre les zones entourant les microcuvettes étant réalisées en un matériau hydrophobe (27). Les gouttes (29) de réactif sont ainsi guidées dans les microcuvettes (23) en raison des zones hydrophobes (27). On peut augmenter ainsi la densité de sites d'analyse sur le support.



BEST AVAILABLE COPY

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

DISPOSITIF COMPRENANT UNE PLURALITE DE SITES D'ANALYSE SUR UN SUPPORT

5

DESCRIPTION

Domaine technique

La présente invention a pour objet un dispositif d'analyse chimique ou biologique, comprenant un grand nombre de sites d'analyse, utilisable en particulier pour le screening en pharmacologie et pour des tests ADN en biologie.

Dans le cadre du screening, il faut déterminer sur un support comportant un grand nombre de sites recouverts du même réactif, l'effet de différentes molécules que l'on dépose sélectivement sur chaque site de façon séquentielle.

Dans le cas des tests en biologie tels que les tests ADN, chaque site du dispositif est recouvert d'une sonde ADN différente et l'analyte dont on veut connaître la séquence génomique, est mis en contact au moment de l'analyse avec l'ensemble des sites.

En chimie analytique, la demande est également forte vers la miniaturisation des cuvettes de réactions chimiques (ou réacteurs chimiques).

Pour toutes ces applications, il est donc important de disposer d'un support comportant le plus grand nombre possible de sites d'analyse, mais une densification élevée du nombre de sites pose certains problèmes pour obtenir la précision suffisante lors du

dépôt des gouttes de réactif ou d'échantillons sur les sites.

État de la technique antérieure

Le document US-A-5 474 796 [1] décrit un
5 dispositif comportant plusieurs sites d'analyse sur la surface d'un support, dans lequel les sites d'analyse sont formés par des zones hydrophiles séparées par des zones hydrophobes sur un support plan.

La figure 1 annexée représente la structure
10 de ce dispositif avec son support plan 1, sur lequel sont définies les zones hydrophiles 3 et les zones hydrophobes 5.

Ces zones hydrophiles et hydrophobes sont réalisées sur le support 1 par photomasquage, puis
15 réaction d'un silane hydrophile ou hydrophobe avec le support en verre.

Dans ce cas, les zones hydrophiles 3 constituées par des zones planes obligeront les gouttes de réactifs 7 déposées à rester là où elles
20 sont en raison de la présence des zones hydrophobes adjacentes 5.

Une limitation importante de ce dispositif est due au fait que les dispenseurs de réactifs ne permettent pas de réduire la taille de la goutte 7 de
25 façon infinie.

Aussi, lorsqu'on veut augmenter l'intégration et densifier le nombre de sites sur le support, par exemple, passer à un pas inférieur à 300 μm , c'est la résolution du dispenseur qui limite
30 actuellement le système car on pourrait très bien avec les procédés de lithographie restreindre la surface des

zones hydrophiles et hydrophobes pour augmenter la densités de sites.

Un autre paramètre important du dispositif est la surface utile du site car le réactif, par exemple la sonde ADN, est amené sur le site dans une solution qui est séchée sur le site. Aussi, si la surface utile du site est réduite, la quantité de réactif après séchage devient très faible.

Enfin, la manipulation du support comportant en surface les gouttes déposées est délicate.

La présente invention a précisément pour objet un dispositif d'analyse chimique ou biologique, qui permet d'augmenter l'intégration et la densification du nombre de sites sur un support, tout en utilisant les dispenseurs actuels qui en standard ne permettent pas d'avoir des gouttes de taille inférieure à 50 à 1000 picolitres avec une bonne précision spatiale de dépôt.

20 Exposé de l'invention

L'invention a pour objet un dispositif d'analyse chimique ou biologique comprenant un support comportant une pluralité de sites d'analyse aptes à fixer un réactif chimique ou biologique, dans lequel les sites d'analyse sont constitués par des microcuvettes s'étendant en creux dans le support, les parois latérales et le fond des microcuvettes et les zones de la surface du support entourant chaque microcuvette, dénommées bords de microcuvettes, étant réalisés en au moins un matériau hydrophile ou rendu hydrophile par un traitement, et les zones planes du

support disposées entre les zones entourant les microcuvettes étant réalisées en un matériau hydrophobe ou rendu hydrophobe par un traitement.

On précise que dans la description et les
5 revendications qui suivent, les termes "matériau hydrophile" signifient que le matériau est hydrophile ou qu'il a été rendu hydrophile par un traitement.

De même, les termes "matériau hydrophobe" signifient que le matériau est hydrophobe
10 ou qu'il a été rendu hydrophobe par un traitement.

Dans ce dispositif, les microcuvettes peuvent avoir en particulier la forme d'un tronc de cône dont la petite base correspond au fond de la microcuvette.

15 Dans ce dispositif, le fait de disposer de microcuvettes réalisées en matériau hydrophile avec des zones entourant les microcuvettes, ou bords, également en matériau hydrophile, séparées en surface par un matériau hydrophobe, permet d'assurer une zone
20 d'ancrage des gouttes dans l'épaisseur du support, en limitant ainsi le diamètre des sites d'analyse sans restreindre le volume des gouttes. On peut atteindre ainsi une densification de sites actifs plus élevée que dans le cas du support plan de l'art antérieur.

25 Ainsi, la structure de l'invention procure deux avantages intéressants :

- 1) elle permet l'utilisation de dispenseurs de gouttellettes de résolution limitée, et
- 2) elle permet l'utilisation de gouttellettes de
30 diamètre plus grand que celui des microcuvettes permettant une concentration plus importante du soluté, après évaporation du solvant.

Selon un premier mode de réalisation du dispositif de l'invention, les parois latérales, les fonds et les bords des microcuvettes sont réalisés en le même matériau hydrophile. Ceci permet en particulier
5 d'assurer le recentrage et l'ancrage des gouttes de réactifs dans le microcuvettes ainsi que sur le bord des microcuvettes lorsque la goutte déborde de la microcuvette.

Selon un second mode de réalisation du
10 dispositif de l'invention, les fonds des microcuvettes sont réalisés en un premier matériau hydrophile et au moins une partie des parois latérales des microcuvettes ainsi que les bords des microcuvettes sont réalisés en un second matériau hydrophile, seul le premier matériau
15 hydrophile étant apte à fixer le réactif chimique ou biologique.

Cette structure particulière permet d'attirer la goutte dans la microcuvette au moyen du second matériau hydrophile et d'assurer la fixation du
20 réactif dans le fond de la microcuvette par l'intermédiaire du premier matériau hydrophile. Cette disposition est particulièrement intéressante lorsque le réactif est dilué dans une solution aqueuse. La réalisation de microcuvettes permet aussi également
25 d'observer à l'étape d'analyse une fluorescence dans un plan différent du plan du substrat qui souvent génère un signal parasite (fluorescence) intrinsèque à la nature du substrat.

Ainsi, la goutte de solution aqueuse
30 mouillera le second matériau hydrophile mais le réactif présent en faible quantité sera fixé sur le fond de la microcuvette.

Selon l'invention, le support du dispositif peut être un support passif en verre, en silicium ou en polymère organique, n'ayant pas de fonction particulière. On peut aussi utiliser dans l'invention
5 un support comprenant un substrat actif à système électronique intégré ayant diverses fonctions électroniques, par exemple d'adressage des sites, de chauffage localisé ou de CCD pour la détection intégrée de fluorescence.

10 Un substrat actif de ce type est décrit par exemple dans le document Eggers et al, A versatile biochip for gene-based diagnostics, 1996, IEEE, p. 87-92 [2]. Dans le cas de tels supports, le substrat actif est généralement recouvert d'une couche de polymère
15 dans laquelle sont formées les microcuvettes.

Dans le dispositif de l'invention le(s) matériau(x) hydrophile(s) peuvent être des matériaux comportant des groupes hydrophiles choisis parmi les groupements époxy, -OH, -SH, -NH-, -NH₂ et -COOH.

20 Le matériau hydrophobe peut être constitué par le support lui-même dans le cas d'un support en polymère organique hydrophobe ou être formé sur le support. Généralement, le matériau hydrophobe comporte des groupes hydrocarbonés ou fluorocarbonés.

25 Le matériau de base utilisé, verre ou silicium, peut être rendu sélectivement hydrophile ou hydrophobe par un traitement de surface approprié.

L'invention a encore pour objet un procédé de fabrication d'un dispositif d'analyse chimique ou
30 biologique tel que décrit ci-dessus.

Selon un premier mode de réalisation, ce procédé comprend les étapes suivantes :

a) réaliser en creux sur la surface du support des microcuvettes (ou micropuits ou microcavités),

b) définir les zones de la surface du support devant comporter un matériau hydrophobe, et

5 c) former ensuite un matériau hydrophile sur les zones de la surface du support et des microcuvettes ne comportant pas de matériau hydrophobe.

Selon une variante de mise en oeuvre de ce premier mode de réalisation, le procédé comprend les
10 étapes suivantes :

a) réaliser en creux sur la surface du support des microcuvettes, et

b) former un matériau hydrophile sur les zones de la surface du support devant comporter un matériau
15 hydrophile.

Les procédés décrits ci-dessus sont adaptés à la réalisation de microcuvettes dont les parois latérales, les fonds et les bords sont réalisés en le même matériau hydrophile.

20 Selon un second mode de réalisation du procédé de l'invention adapté à la formation des microcuvettes comportant deux matériaux hydrophiles différents, le procédé comprend avantageusement les étapes suivantes :

25 a) réaliser en creux sur la surface du support des microcuvettes,

b) définir les zones de la surface du support devant comporter un matériau hydrophobe,

c) définir ensuite sur la surface du support ne
30 comportant pas de matériau hydrophobe et sur la surface des microcuvettes, des premières zones correspondant aux emplacements du premier matériau hydrophile et des

secondes zones correspondant aux emplacements du second matériau hydrophile, et

- e) former le premier matériau hydrophile sur les premières zones et le second matériau hydrophile sur les secondes zones.

Lorsque le support est en un matériau non hydrophobe, le procédé comprend de plus une étape complémentaire de formation d'un matériau hydrophobe sur les zones de la surface du support devant comporter un matériau hydrophobe.

Pour mettre en oeuvre le procédé de l'invention, on commence tout d'abord par creuser des microcuvettes dans l'épaisseur du support. Des techniques classiques de lithographie suivies de gravure sèche ou de gravure chimique peuvent être utilisées pour cette opération.

Lorsque le support est en silicium, on peut réaliser les microcuvettes par gravure chimique préférentielle des plans cristallins, ce qui permet d'obtenir une microcuvette avec un flanc à 54 ° et un fond plat. Le pas des microcuvettes peut aller de 10 à 500 µm et la profondeur des microcuvettes peut être de 5 à 500 µm. On utilise généralement un procédé lithographique pour définir les microcuvettes aux endroits voulus.

Dans le cas d'un support en verre, on peut réaliser les microcuvettes par gravure sèche isotrope, sans angles, en utilisant également un procédé lithographique pour définir l'emplacement des microcuvettes.

Dans le cas où le support comprend un substrat actif à fonction électronique, le support est de préférence muni sur sa surface supérieure d'une

couche de polymère ou d'oxyde minéral dans laquelle on réalise les microcuvettes par gravure, en utilisant également un procédé lithographique pour définir l'emplacement des microcuvettes.

5 Dans tous les cas, on peut obtenir des microcuvettes de 5 à 500 μm de profondeur, avec un pas de microcuvettes de 10 à 500 μm , et une ouverture supérieur de microcuvette de 3 à 450 μm .

Les étapes suivantes du procédé consistent
10 à former sur la surface du support les zones de matériau hydrophobe et les zones de matériau(x) hydrophile(s).

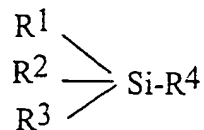
Ces zones peuvent être formées en modifiant la surface du support par greffage de groupes
15 hydrophobes ou hydrophiles.

Toutefois, dans le cas où le support est en polymère organique hydrophobe ou recouvert de polymère organique hydrophobe, il n'est pas nécessaire de modifier la surface du support pour créer les zones
20 hydrophobes.

Lorsque le support est en silicium ou en verre, on peut réaliser cette modification en faisant réagir le silicium ou le verre avec un agent de silanisation hydrophobe ou hydrophile.

25 Dans le cas où le support est en silicium, on le soumet préalablement à une oxydation puis à un traitement classique de nettoyage (ex : HCl) pour disposer de groupements OH en surface permettant la réaction avec l'agent de silanisation.

30 L'agent de silanisation hydrophobe peut être un silane de formule :



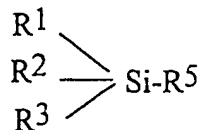
dans laquelle R^1 , R^2 et R^3 qui peuvent être identiques ou différents, sont choisis parmi les groupes alkoxy en 5 C_1 à C_3 et les atomes d'halogènes (de préférence le chlore), et R^4 est un groupe hydrocarboné ou fluorocarboné, linéaire ou ramifié.

De préférence, le groupe hydrocarboné ou fluorocarboné comprend de 4 à 18 atomes de carbone.

10 A titre d'exemples d'agent de silanisation hydrophobe, on peut citer les composés suivants :

- un produit commercial dénommé "Repelsilane",
- l'octadécyl trichlorosilane,
- l'octadécyl triéthoxysilane,
- 15 - le tridécafluoro-1,1,2,2-tétrahydrooctyldiméthyl chlorosilane,
- le 3-(1,1-dihydroperfluorooctyloxy) propyltriéthoxysilane,
- l'hexaméthyl disilazane (HMDS).

20 L'agent de silanisation hydrophile, peut être constitué par un silane de formule :



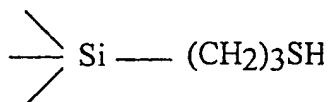
25 dans laquelle R^1 , R^2 et R^3 qui peuvent être identiques ou différents, sont choisis parmi les groupes alkoxy en C_1 à C_3 et les atomes d'halogène, de préférence le chlore, et R^5 est un groupe hydrocarboné, linéaire ou ramifié, comportant au moins un groupe hydrophile

choisi parmi les groupes époxy, -OH, -SH, -NH₂, -NH- et -COOH.

Le groupe hydrocarboné comprend avantageusement 3 à 18 atomes de carbone.

5 A titre d'exemples d'agent de silanisation hydrophile, on peut citer les composés suivants :

- l'aminopropyl triméthoxysilane "γ APS",
- la triméthoxysilylpropyl-diéthylènetriamine "DETA",
- 10 - le N-(2-aminoéthyl)-3-aminopropyltriméthoxysilane "EDA",
- le N,N-bis(hydroxyéthyl)aminopropyltriéthoxysilane,
- le produit commercial "Bind Silane",
- 15 - l'aminoéthylaminométhyl phénétyl triméthoxysilane "PEDEA" ou encore le mercaptopropyltriméthoxysilane



On peut aussi former le matériau hydrophobe et/ou le matériau hydrophile sur le support en
 20 utilisant pour l'introduction des groupes hydrophiles ou hydrophobes, des thiols ou des disulfures. Dans ce cas, on dépose tout d'abord sur les zones à modifier une couche métallique en or, en argent, en cuivre ou en l'un de leurs alliages, puis on fait réagir cette
 25 couche avec un thiol ou un disulfure comportant un ou plusieurs groupes hydrophiles ou hydrophobes. Comme précédemment, les groupes hydrophobes peuvent être des groupes hydrocarbonés ou fluorocarbonés, linéaires ou ramifiés. Les groupes hydrophiles peuvent être choisis
 30 parmi les groupes époxy, -OH, -NH-, -NH₂, -COOH et -SH.

Pour fonctionnaliser Au, Ag, Cu, à titre de thiols et de disulfures utilisables, on peut citer les composés suivants :

- l'octadécane thiol, R-SH ($R=C_8$ à C_{18}), hydrophobe
- 5 - l'hexadécane thiol,
- le 3-mercaptopropionique acide → hydrophile (pour rendre l'or hydrophile).

Selon le procédé de l'invention, les zones
10 de matériau(x) hydrophile(s) ou rendu(s) hydrophile(s) et les zones de matériau hydrophobe ou rendu hydrophobe peuvent être définies sur le support par les techniques classiques de la micro-électronique, en utilisant par exemple des procédés lithographiques
15 employant des photorésists négatifs ou positifs, avec un niveau de masquage et des développements de résine. Les zones développées sont traitées puis on enlève la résine et on traite les zones mises à nu par un autre agent de silanisation.

20 Ainsi, selon l'invention, on peut former les zones hydrophiles et hydrophobes sur le support par des procédés de gravure, en traitant par exemple toute la surface du support pour le rendre hydrophile ou hydrophobe, et en éliminant ensuite le matériau
25 hydrophile ou hydrophobe sur certaines zones du support, par exemple au moyen d'un laser. Les zones mises à nu peuvent ensuite être traitées pour former les zones hydrophobes ou hydrophiles voulues.

D'autres caractéristiques et avantages de
30 l'invention apparaîtront mieux à la lecture de la description qui suit, donnée bien entendu à titre illustratif et non limitatif, en référence aux dessins annexés.

Brève description des dessins

La figure 1 déjà décrite illustre
5 schématiquement un dispositif conforme à l'art
antérieur.

La figure 2 illustre le premier mode de
réalisation du dispositif de l'invention.

La figure 3 illustre le deuxième mode de
10 réalisation du dispositif de l'invention.

Les figures 4A et 4B illustrent la mise en
place de goutte de réactif dans un dispositif conforme
à l'invention.

Les figures 5 à 7 illustrent l'intérêt du
15 second mode de réalisation du dispositif de l'invention
pour accrocher le réactif biologique au fond de la
microcuvette.

Les figures 8A à 8E illustrent les
différentes étapes du procédé de fabrication du
20 dispositif de l'invention, lorsqu'on utilise une
silanisation pour la réalisation des zones hydrophobes
et hydrophiles.

Les figures 9A à 9D illustrent les
différentes étapes du procédé de fabrication d'un
25 dispositif conforme à l'invention utilisant des thiols
pour former les zones hydrophiles et hydrophobes.

Les figures 10A à 10C illustrent les étapes
du procédé de fabrication d'un dispositif de
l'invention utilisant un substrat actif à fonction
30 électronique, recouvert d'une couche de polymère
hydrophobe.

Les figures 11A à 11G illustrent les
différentes étapes du procédé de fabrication d'un

dispositif conforme au second mode de réalisation de l'invention.

Exposé détaillé des modes de réalisation

5

Sur la figure 2, on a illustré le premier mode de réalisation du dispositif de l'invention, dans lequel on utilise un seul matériau hydrophile.

10 Sur cette figure, on voit le support 21 dans lequel sont creusées les microcuvettes 23 qui ont une forme tronconique dont la petite base correspond au fond 24 de la microcuvette. Dans le premier mode de réalisation de l'invention, les fonds 24, les parois latérales 25 et les zones de la surface du support
15 entourant chaque microcuvette, dénommées ci-après bords des microcuvettes 26, sont constitués de matériau hydrophile, alors que la surface du support située entre les bords des microcuvettes est constituée de matériau hydrophobe 27.

20 La figure 3 représente de façon schématique le second mode de réalisation du dispositif de l'invention, dans lequel on utilise deux matériaux hydrophiles différents.

Sur cette figure, on a repris les mêmes
25 références pour désigner le support 21, les microcuvettes 23 et les zones de matériau hydrophobe 27. Dans ce cas, les fonds des microcuvettes 24 et une partie de leurs parois latérales 25a sont réalisés en un premier matériau hydrophile alors que le reste de
30 leur parois latérales 25b et les bords 26 sont réalisés en un second matériau hydrophile. Ceci permet, comme on le verra ci-après de réaliser l'accrochage du réactif chimique ou biologique au fond des microcuvettes.

Dans ces deux modes de réalisation du dispositif de l'invention, la structuration tridimensionnelle du support permet d'obtenir de nombreux avantages.

5 En effet, cette structuration permet de limiter la surface des sites réactifs correspondant à l'ouverture des microcuvettes, puisque celles-ci sont creusées dans l'épaisseur du support et peuvent contenir davantage de réactif ou d'échantillon pour une
10 surface utile plus petite.

Ainsi, on peut diminuer le pas et la taille des microcuvettes à des dimensions microniques sans être limité, d'une part, par la précision de positionnement du robot dispenseur de réactifs ou
15 d'échantillons et, d'autre part, par le volume des gouttes. Par ailleurs, la réalisation sur le pourtour des microcuvettes et dans les microcuvettes de zones hydrophiles par rapport au reste du support hydrophobe permet l'ancrage et le guidage de la goutte dans la
20 microcuvette comme on peut le voir sur les figures 4A et 4B.

En se reportant à la figure 4A, on voit le dispositif conforme à ce premier mode réalisation de l'invention, qui comporte un support 21 muni de
25 microcuvettes 23 avec les zones hydrophiles 24 et les zones hydrophobes 27.

Sur la figure 4A, on a représenté le dispositif dans le stade d'alimentation en gouttes 29 de réactif ou d'échantillon qui peuvent être déposés
30 par un microdispenseur (robot de micropipettage) ou par des têtes d'impression à jet d'encre.

Comme on le voit sur la figure 4A, les gouttes ne sont pas forcément positionnées au droit de

l'ouverture des microcuvettes. Mais la présence des zones hydrophiles 24 et hydrophobes 27 permet l'ancrage et le guidage de la goutte dans la microcuvette. En effet, en raison des tensions superficielles créées par l'hydrophilicité de la surface, la goutte déposée va pouvoir glisser pour se positionner et remplir parfaitement les microcuvettes comme représenté sur la figure 4B. Ainsi, pour une taille de goutte donnée, on peut réduire le pas des sites réactifs sur le support sans risque de pontage entre les gouttes, donc de mixage des réactifs. Par ailleurs, même avec une précision de placement de gouttes imparfaite, on obtient une répartition spatiale parfaite donnée par la position des microcuvettes qui peut être extrêmement précise par l'utilisation du micro-usinage, comme on le verra ci-après.

Avec ce dispositif, on note également que le rapport volume/surface au contact du réactif est augmenté pour une occupation au sol identique. Cela veut dire que si le réactif contient des substances devant se fixer après séchage sur la zone hydrophile, il y en aura beaucoup plus.

Par ailleurs, ce type de structure peut être ajouté au-dessus d'un substrat actif, par exemple une puce à ADN avec moyens de chauffage ou de lecture intégrés.

Enfin, cette structure du dispositif de l'invention est compatible avec les procédés de synthèse d'ADN in situ localisée. En effet, une fois que la première base de la sonde est fixée dans les microcuvettes, la sonde peut être construite base après base dans ces microcuvettes.

Sur les figures 5 à 7, on a illustré l'intérêt d'utiliser un dispositif conforme au second mode de réalisation du dispositif de l'invention, pour la réalisation de puces à ADN.

5 Sur la figure 5, on voit l'une des microcuvettes du dispositif, qui comporte un support 51 muni de microcuvettes 53, avec présence d'un premier matériau hydrophile 55 et d'un second matériau hydrophile 57 dans les microcuvettes et sur leurs
10 bords, et d'un matériau hydrophobe 59 entre les microcuvettes.

Sur cette figure, on a illustré les groupes hydrophiles 56 du premier matériau hydrophile, les groupes hydrophiles 58 du second matériau hydrophile et
15 les groupes hydrophobes 60 du matériau hydrophobe. On remarque ainsi que les groupes hydrophiles 56 sont différents des groupes hydrophiles 58, les groupes hydrophiles 56 étant choisis pour fixer le réactif, par exemple les sondes nucléiques 63 présentes dans la
20 goutte de réactif 65. La figure 5 correspond ainsi au stade d'alimentation en gouttes du dispositif.

Sur la figure 6, on a illustré la phase de recentrage de la goutte 65 sur les zones hydrophiles en raison de la répulsion des zones hydrophobes 59.

25 La figure 7 illustre l'étape de fixation des sondes nucléiques 63 sur le premier matériau hydrophile 55 par réaction des groupes hydrophiles 64 de la sonde avec les groupes hydrophiles 56 du premier matériau hydrophile 55.

30 A titre d'exemple, la sonde nucléotidique peut être fonctionnalisé avec un groupe OH et le premier matériau hydrophile 55 peut comporter des groupes hydrophiles OH tandis que le second matériau

hydrophile comporte des groupes hydrophiles COOH ou NH₂. De cette façon, il n'y aura couplage avec la sonde que sur le premier matériau hydrophile 55.

Une technique de fixation de sondes
5 oligonucléotidiques sur des surfaces de verre
préalablement modifiées par silanisation est décrite
par Beattie et al dans Clin. Chem., vol. 39, n°4, 1993,
pages 714-722 [3].

Ce mode de réalisation du dispositif de
10 l'invention est particulièrement intéressant car
lorsqu'on réduit le pas des microcuvettes, les sites
recouverts par les différents réactifs deviennent très
proches les uns des autres, ce qui pose un problème
lors de la détection si on lit par fluorescence les
15 résultats. En permettant l'emploi de gouttes
relativement volumineuses tout en conservant un espace
suffisant entre sites à réactif, on simplifie la chaîne
d'acquisition.

De plus, avec cette amélioration, on
20 n'obtient du réactif que sur le fond des microcuvettes,
ce qui permettra de situer l'endroit de la réaction
chimique éventuelle sur un plan différent. Ceci est
utilisable par un système de lecture pour s'affranchir
par exemple de la fluorescence parasite de la surface
25 du support (focalisation différentielle).

Les microcuvettes décrites ci-dessus sont
aptées à recevoir des gouttes dispensées mécaniquement.
On a vu que deux avantages particuliers à l'invention
doivent être pris en compte :

30 - pallier à la précision intrinsèque du
dispenseur : la goutte même mal centrée « bascule » dans
la microcuvette grâce à la zone hydrophile (26 ou 57)
qui déborde sur la partie plane du substrat autour de

chaque cuvette.

- permettre à une quantité importante de réactifs contenue dans la goutte de se fixer dans la cuvette. On pourra déposer une goutte bien plus volumineuse que la
5 cuvette, elle sera centrée sur la cuvette grâce aux zones hydrophiles débordant de la cuvette. Ceci est très important car les réactifs contenus dans la goutte ne peuvent pas être trop concentrés sous peine d'avoir des problèmes à la dispense.

10 Au niveau topologie et à titre d'illustration deux types de cuvettes ont été réalisées, qui présentent les dimensions suivantes repérées sur la figure 2 :

1°) :

- 15 - Diamètre de cuvette en fond de trou D : 100 μm .
 - Profondeur de cuvette P : 30 μm
 - Zone débordante sur la partie plane de chaque côté L : 15 μm .
 - Pas : 180 μm .

20 2) :

- Diamètre de cuvette en fond de trou D : 70 μm .
 - Profondeur de cuvette P : 20 μm .
 - Zone débordante sur la partie plane de chaque côté L : 10 μm .
25 - Pas : 140 μm .

 Sur les figures 8A à 8E, on a illustré les différentes étapes de réalisation d'un dispositif conforme à l'invention, utilisant un seul matériau hydrophile et dans lequel on forme les zones
30 hydrophiles et hydrophobes par silanisation, le support étant en silicium.

Sur la figure 8A, on voit le support 21 en silicium de départ.

Sur la figure 8B, on a représenté l'étape de formation des microcuvettes 23 dans le support 21.

5 Ceci peut être effectué par lithographie et gravure chimique selon des plans cristallins. On obtient ainsi des microcuvettes tronconiques avec un flanc à 54° et un fond plat. Le pas des microcuvettes peut aller de 10 à 500 μm et leur profondeur peut être de 5 à 10 500 μm , ceci pour pouvoir s'adapter aux tailles de gouttes dispensées par les automates de dépôt de réactifs.

Après lithogravure des microcuvettes, on soumet l'ensemble à un traitement d'oxydation thermique

15 à une température supérieure à 800°C , par exemple à 850°C , pour disposer de groupements OH à la surface du silicium.

Sur la figure 8C, on a représenté l'étape de définition des zones de matériau hydrophobe au moyen

20 d'un masque. Ce masque peut être constitué par une résine photosensible R que l'on dépose sur le support, et que l'on soumet ensuite à une insolation selon le motif à obtenir suivie d'un développement pour mettre à nu les zones qui devront être hydrophobes. La résine R

25 peut être n'importe quel photorésist utilisable en microélectronique. On peut utiliser en particulier la résine Shippley positive (S1813 ou STR1075), ou négative SAL 601 et le développeur Microposit MF 319.

Sur la figure 8D, on a représenté l'étape

30 de création des zones de matériau hydrophobe 27 par silanisation hydrophobe du support en silicium mis à nu au moyen de l'agent de silanisation par exemple le

tridécafluorotétrahydro-octyltriéthoxy-silane (appelé aussi F13).

Après création des zones de matériau hydrophobe 27, on élimine la résine R par dissolution par exemple dans l'acétone pour mettre à nu les zones devant comporter le matériau hydrophile.

Sur la figure 8E, on a représenté la réalisation des zones de matériau hydrophile 24 par silanisation hydrophile au moyen de EDA, γ APS ou DETA.

Les figures 9A à 9D illustrent une variante de réalisation du dispositif de l'invention avec un support en silicium recouvert d'une métallisation en or, dans laquelle on utilise des thiols pour la création du matériau hydrophile et du matériau hydrophobe. Dans ce cas, comme précédemment on réalise en creux dans le support en silicium 21 des microcuvettes tronconiques 23 par lithogravure chimique selon des plans cristallins, puis on dépose sur l'ensemble du support de l'or pour former une couche ayant une épaisseur de 50 à 5000 Å.

La figure 9A représente le support 21 muni des microcuvettes 23 et revêtu d'une couche d'or M.

Après création des microcuvettes, on définit les zones de matériau hydrophobe par lithographie au moyen d'une résine photosensible R comme décrit précédemment.

On obtient ainsi la structure représentée sur la figure 9B où la couche d'or M est mise à nu sur les zones qui devront être hydrophobes.

On forme ensuite le matériau hydrophobe par réaction du dépôt d'or mis à nu avec un thiol hydrophobe tel que l'octadécane thiol $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{17}-\text{SH}$.

On obtient ainsi la structure représentée sur la figure 9C avec les zones de matériau hydrophobe 27. Après cette opération, on élimine comme précédemment la couche de résine R par dissolution dans l'acétone et on traite par un thiol hydrophile les zones dégagées. On peut utiliser comme thiol hydrophile $\text{HO}(\text{CH}_2)_n\text{SH}$, $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_n\text{SH}$ ($n = 3$ à 18).

On obtient ainsi la structure représentée sur la figure 9D, comportant les zones de matériau hydrophile 24 séparées par les zones de matériau hydrophobe 27.

Bien que dans les deux exemples décrits ci-dessus, on ait réalisé les matériaux hydrophobes et hydrophiles par un traitement de silanisation ou de modification au moyen d'un thiol, il va de soi que l'on pourrait combiner ces deux possibilités de modification de la surface du support en effectuant certaines zones par silanisation et d'autres zones par réaction du support avec un thiol ou par d'autres techniques d'hydrophilisation ou d'hydrophobisation.

Dans le cas où le support est un verre, on peut former les microcuvettes par une gravure isotropique sans angle et former ensuite les zones de matériau hydrophile et les zone de matériau hydrophobe par les procédés décrits ci-dessus. Dans le cas où on forme ces zones par silanisation, il n'est pas nécessaire de soumettre le support à une oxydation, après gravure des microcuvettes car le verre comporte les fonctions OH nécessaires pour les étapes suivantes. On peut aussi, dans le cas d'un substrat en verre, réaliser les zones de matériau hydrophile et de matériau hydrophobe après dépôt d'or par réaction avec un thiol et combiner ces procédés.

L'intérêt du substrat en verre est de permettre la réalisation des microcuvettes par une gravure isotropique, ce qui conduit à des microcuvettes sans angles facilitant ainsi les diverses opérations de rinçage.

Comme on l'a vu précédemment, l'invention peut être également mise en oeuvre sur un support comportant un substrat actif avec électronique intégrée. Un tel substrat peut permettre un chauffage localisé des sites ou une lecture par CCD d'un appariement réactif-électrolyte à analyser sur ces sites, ou un adressage de chaque site pour y appliquer une tension par exemple. Le substrat actif peut être réalisé en silicium ou en verre en utilisant les techniques des écrans plats.

Dans ce cas, la structure de l'invention est construite au-dessus du substrat actif terminé en recouvrant celui-ci d'une couche d'oxyde minéral ou encore d'une couche de polymère, la couche déposée étant suffisamment épaisse pour y former des microcuvettes de profondeur voulue.

Après réalisation des microcuvettes dans cette couche de polymère ou d'oxyde minéral, on peut définir les zones hydrophiles et hydrophobes comme précédemment par réaction d'une couche d'or avec un thiol. Dans le cas d'une couche de polymère, les zones hydrophobes peuvent aussi être constituées par la couche de polymère.

Sur les figures 10A à 10C, on a illustré les étapes de réalisation de ce dispositif.

Sur la figure 10A, on a représenté le substrat actif 21a muni de plots de surface 21b aux emplacements qui correspondent aux sites d'analyse.

Sur ce substrat 21a, on dépose tout d'abord une couche épaisse de polymères 21c, par exemple de polyimide ayant une épaisseur de 5 à 100 μm , puis on creuse dans cette couche des microcuvettes 23 par exemple par lithogravure, moulage, ...

On dépose ensuite sur les zones du support qui devront être en matériau hydrophile une couche d'or M de façon à définir les zones hydrophiles.

Sur la figure 10B, on a représenté la structure obtenue qui comprend le substrat actif 21a, les plots de surface 21b, la couche de polymères 21c, les microcuvettes 23 et la couche d'or M.

Sur la figure 10C, on a représenté l'étape de formation des zones hydrophiles par traitement de l'ensemble par un thiol hydrophile qui va se fixer sur l'or M pour former les zones de matériau hydrophile 24.

Dans ce cas, il n'est pas nécessaire de réaliser des zones de matériau hydrophobe, celles-ci étant constituées par la couche de polymère 21c restant entre les microcuvettes 23.

Sur les figures 11A à 11G, on a illustré les différentes étapes du procédé de fabrication d'un dispositif conforme au second mode de réalisation de l'invention, comportant deux types de matériaux hydrophiles.

Dans ce cas, comme représenté sur la figure 11A, on part d'un support 51 par exemple en silicium, dans lequel on réalise des microcuvettes 53 de forme tronconique par lithogravure, comme dans le premier exemple de réalisation. On dépose ensuite sur l'ensemble une couche d'or M.

Sur la figure 11B, on a représenté la structure du support après dépôt d'une résine R sur les

endroits qui correspondent aux zones devant comporter le second matériau hydrophile.

Sur la figure 11C, on a représenté la structure obtenue après gravure de l'or pour retirer la couche d'or sur les zones correspondant au matériau hydrophobe et sur les zones correspondant au premier matériau hydrophile, et après élimination de la résine R sur les zones correspondant au second matériau hydrophile.

Sur la figure 11D, on a représenté la structure obtenue après protection des fonds des microcuvettes par une de résine R identique ou différente de la première résine R. Cette protection peut être obtenue par les techniques lithographique en déposant une résine photosensible insolée aux endroits voulus et éliminé ensuite sur les zones voulues.

Sur la figure 11E, on a représenté la création des zones de matériau hydrophobe 59 qui sont formées par silanisation hydrophobe du support au moyen de Repel Silane.

Sur la figure 11F, on a représenté la création des zones 57 du second matériau hydrophile par réaction de l'or avec un thiol hydrophile comportant des groupe COOH ou NH₂, par exemple HOOC-(CH₂)₂-SH.

Sur la figure 11G, on a représenté la structure finale obtenue après avoir éliminé la résine R du fond des microcuvettes et avoir soumis le support à un traitement de silanisation au moyen de OH(CH₂)₁₆-SH.

Ainsi, avec le traitement de silanisation, on obtient un premier matériau hydrophile 55 comportant des groupes hydrophiles OH alors que les zones 57 du second matériau hydrophile comportent des groupes

hydrophiles COOH. Ainsi, en utilisant un réactif à groupes OH tel qu'un oligonucléotide, un linker ou un précurseur de synthèse nucléotidique, fonctionnalisé avec un groupe OH, on pourra fixer préférentiellement
5 ce réactif dans le fond des microcuvettes.

Bien entendu, dans l'exemple de réalisation décrit ci-dessus, l'ordre des étapes pourrait être différent. De même, on pourrait utiliser d'autres techniques pour créer respectivement les zones 57 et
10 55 du premier et du second matériau hydrophile, et supprimer l'étape de création des zones 59 de matériau hydrophobe dans le cas d'un support hydrophobe.

Références citées

15

[1] : US-A-5 474 796.

[2] : Eggers et al, A versatile biochip for gene-based diagnostics, 0-7803-3271-7/96, 1996, IEEE, p. 87-92.

20 [3] : Beattie et al dans Clin. Chem., vol. 39, n°4, 1993, pages 719-722.

REVENDEICATIONS

1. Dispositif d'analyse chimique ou biologique comprenant un support comportant une pluralité de sites d'analyse aptes à fixer un réactif chimique ou biologique, dans lequel les sites d'analyse sont constitués par des microcuvettes (23,53) s'étendant en creux dans le support (21,51), les parois latérales et le fond des microcuvettes et les zones de la surface du support entourant chaque microcuvette, dénommées bords de microcuvettes, étant réalisés en au moins un matériau hydrophile (24, 26, 55, 57), et les zones planes du support disposées entre les zones entourant les microcuvettes étant réalisées en un matériau hydrophobe (27, 59).

2. Dispositif selon la revendication 1, dans lequel les microcuvettes ont la forme d'un tronc de cône dont la petite base correspond au fond de la microcuvette.

3. Dispositif selon la revendication 1 ou 2, dans lequel les parois latérales, les fonds et les bords des microcuvettes sont réalisés en le même matériau hydrophile.

4. Dispositif selon la revendication 1 ou 2, dans lequel les fonds des microcuvettes sont réalisés en un premier matériau hydrophile (24,55), et au moins une partie des parois latérales des microcuvettes ainsi que les bords des microcuvettes sont réalisés en un second matériau hydrophile (26, 57), seul le premier matériau hydrophile étant apte à fixer le réactif chimique ou biologique.

5. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le(s) matériau(x)

hydrophile(s) comportent des groupes hydrophiles choisis parmi les groupements époxy, -OH, -SH, -NH-, -NH₂ et -COOH.

5 6. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel le matériau hydrophobe comprend des groupes hydrophobes choisis parmi les groupes hydrocarbonés et fluorocarbonés.

10 7. Dispositif selon les revendications 4 et 5, dans lequel le premier matériau hydrophile comporte des groupes hydrophiles différents de ceux du second matériau hydrophile.

15 8. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans lequel le support comprend un substrat actif à système électronique intégré à fonction électronique.

9. Dispositif selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans lequel le réactif biologique est un oligonucléotide.

20 10. Procédé de fabrication d'un dispositif d'analyse chimique ou biologique selon la revendication 3, comprenant les étapes suivantes :

a) réaliser en creux sur la surface du support des microcuvettes,

25 b) définir les zones de la surface du support devant comporter un matériau hydrophobe, et

c) former un matériau hydrophile sur les zones de la surface du support et des microcuvettes ne comportant pas de matériau hydrophobe.

30 11. Procédé de fabrication d'un dispositif d'analyse chimique ou biologique selon la revendication 3, comprenant les étapes suivantes :

a) réaliser en creux sur la surface du support des microcuvettes, et

b) former un matériau hydrophile sur les zones de la surface du support devant comporter un matériau hydrophile.

12. Procédé de fabrication d'un dispositif
5 d'analyse chimique ou biologique selon la revendication 4, qui comprend les étapes suivantes :

a) réaliser en creux sur la surface du support des microcuvettes,

b) définir les zones de la surface du support
10 devant comporter un matériau hydrophobe,

c) définir ensuite sur la surface du support ne comportant pas de matériau hydrophobe et sur la surface des microcuvettes, des premières zones correspondant aux emplacements du premier matériau hydrophile et des
15 secondes zones correspondant aux emplacements du second matériau hydrophile, et

e) former le premier matériau hydrophile sur les premières zones et le second matériau hydrophile sur les secondes zones.

20 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 12 comprenant une étape complémentaire de formation d'un matériau hydrophobe sur les zones de la surface du support devant comporter un matériau hydrophobe.

25 14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, dans lequel les microcuvettes sont réalisées par gravure.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, dans lequel le support comprend
30 une couche de surface en polymère ou en oxyde minéral déposée sur un substrat actif à fonction électronique, et les microcuvettes sont réalisées par gravure dans la couche de polymère ou d'oxyde.

16. Procédé selon la revendication 13, dans lequel le support étant en silicium ou en verre, on forme le matériau hydrophobe par réaction du verre ou du silicium soumis préalablement à une oxydation, avec
5 un agent de silanisation hydrophobe.

17. Procédé selon la revendication 16, dans lequel l'agent de silanisation hydrophobe est un silane de formule :



dans laquelle R^1 , R^2 et R^3 qui peuvent être identiques ou différents, sont choisis parmi les groupes alcoxy en C_1 à C_3 et les atomes d'halogène, et R^4 est un groupe
15 hydrocarboné ou fluorocarboné, linéaire ou ramifié.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, dans lequel le support étant en silicium ou en verre, on forme le matériau hydrophile par réaction du verre ou du silicium qui a été soumis
20 préalablement à une oxydation, avec un agent de silanisation hydrophile.

19. Procédé selon la revendication 18, dans lequel l'agent de silanisation hydrophile est un silane de formule :



dans laquelle R^1 , R^2 et R^3 qui peuvent être identiques ou différents, sont choisis parmi les groupes alcoxy en C_1 à C_3 et les atomes d'halogène, et R^5 est un groupe

hydrocarboné, linéaire ou ramifié, comportant au moins un groupe hydrophile choisi parmi les groupes époxy, -OH, -SH, -NH₂, -NH- et -COOH.

20. Procédé selon la revendication 13, dans
5 lequel on forme le matériau hydrophobe par réaction d'une couche métallique en or, argent, cuivre ou un de leurs alliages, déposée sur les zones du support qui doivent être formées du matériau hydrophobe, par
10 réaction de cette couche avec un thiol ou un disulfure comportant un groupe hydrocarboné ou fluorocarboné hydrophobe.

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, dans lequel on forme le
15 matériau hydrophile par réaction d'une couche métallique en or, argent, cuivre ou un de leurs alliages, déposée sur les zones du support qui doivent être formées du matériau hydrophile, par réaction de
20 cette couche avec un thiol ou un disulfure comportant au moins un groupe hydrophile choisi parmi les groupes époxy, -OH, -SH, -NH-, -NH₂ et -COOH.

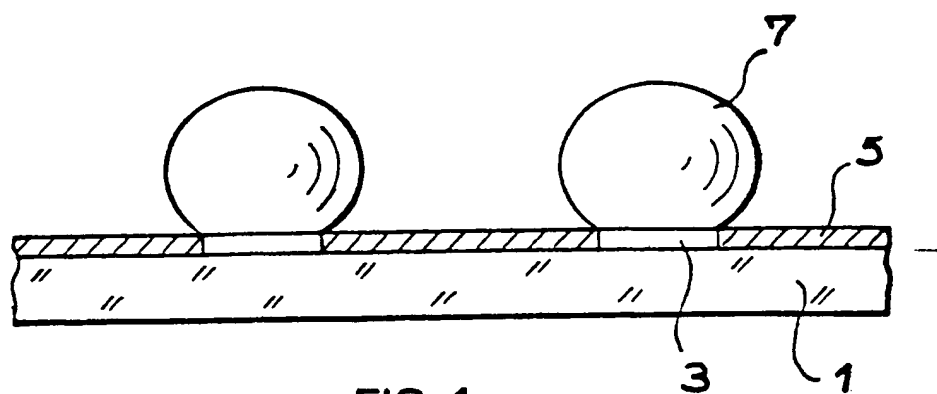


FIG. 1

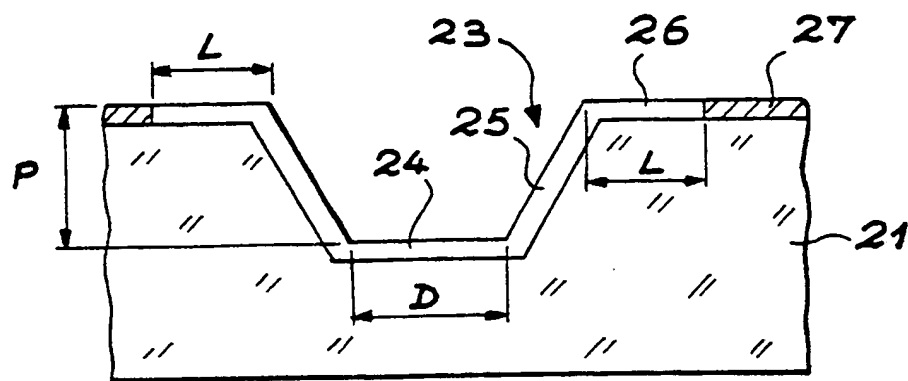


FIG. 2

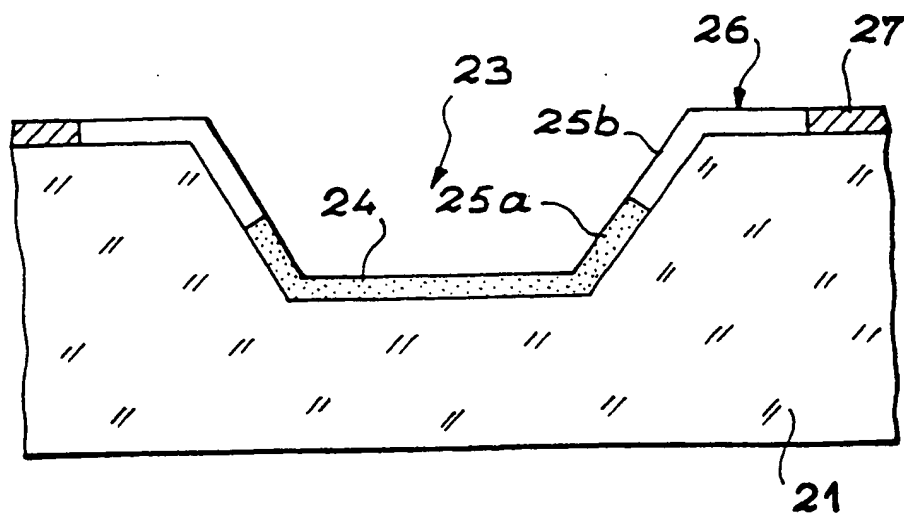


FIG. 3

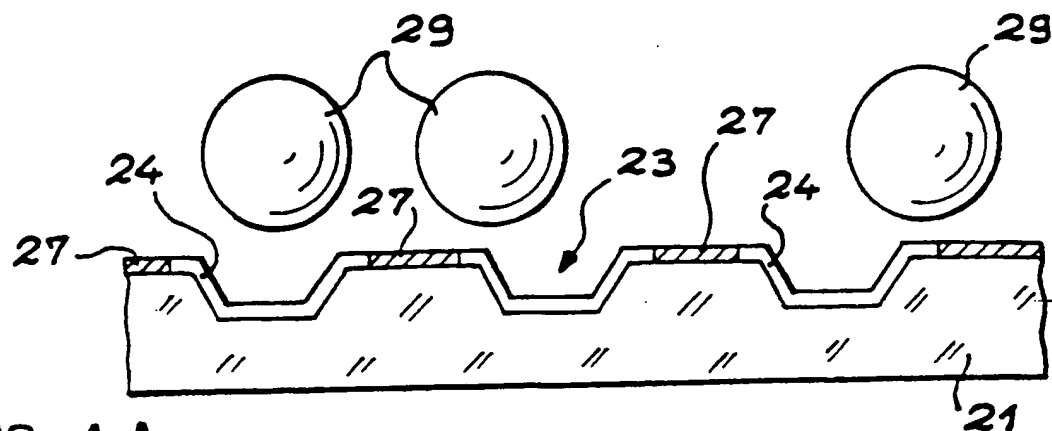


FIG. 4 A

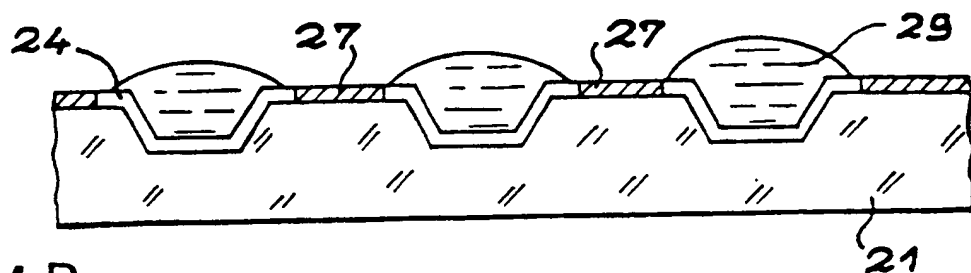


FIG. 4 B

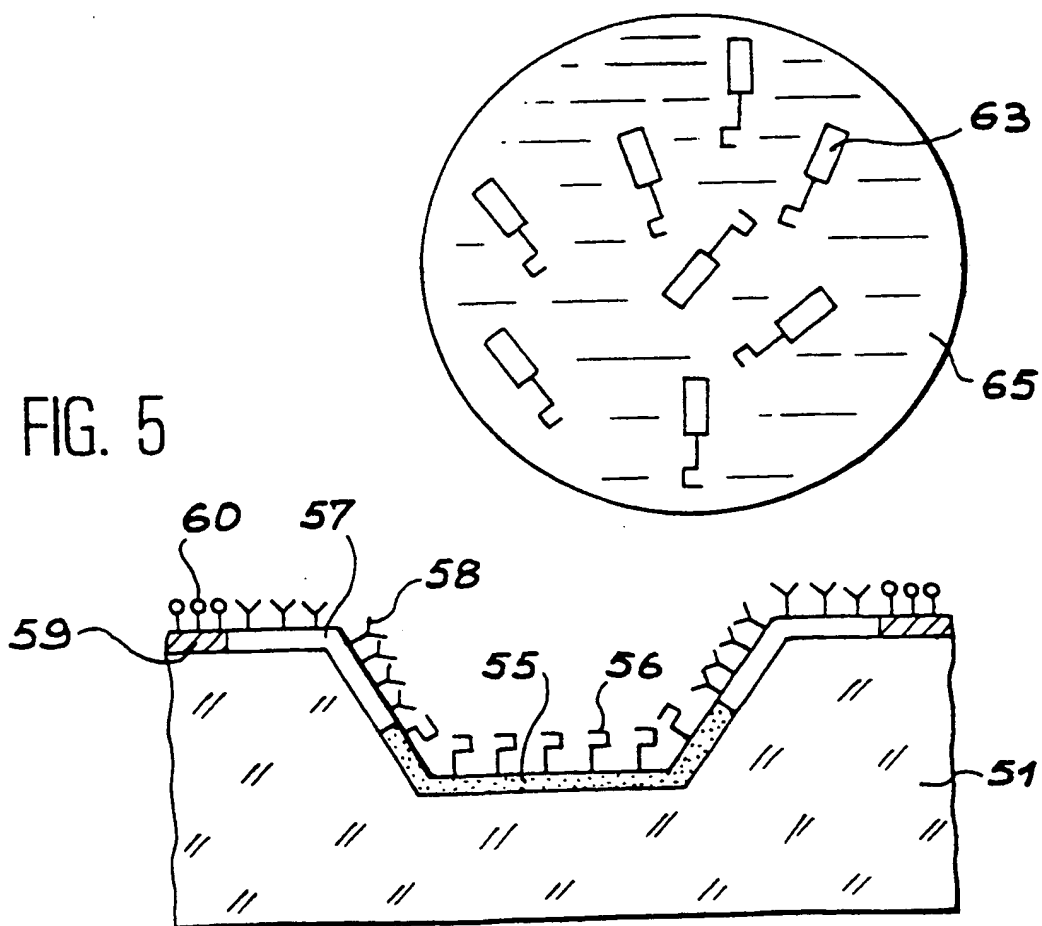


FIG. 5

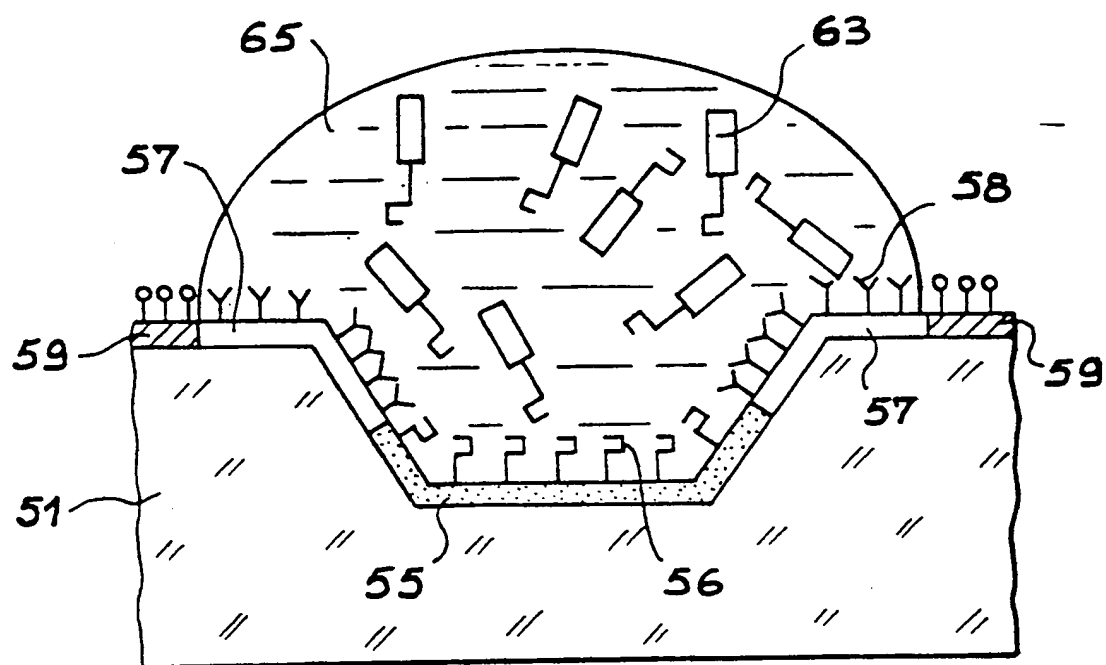


FIG. 6

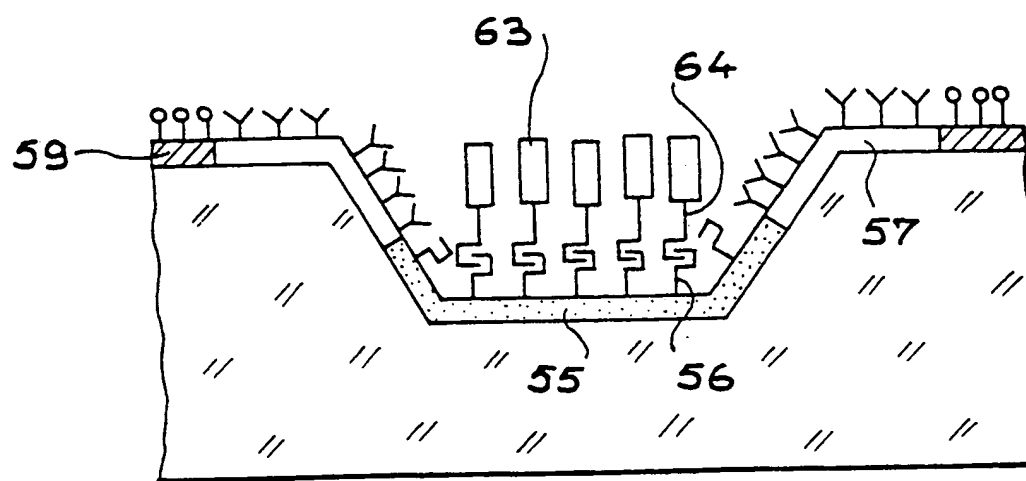


FIG. 7

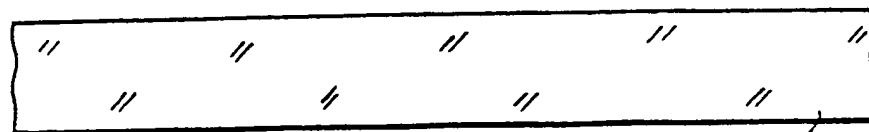


FIG. 8 A

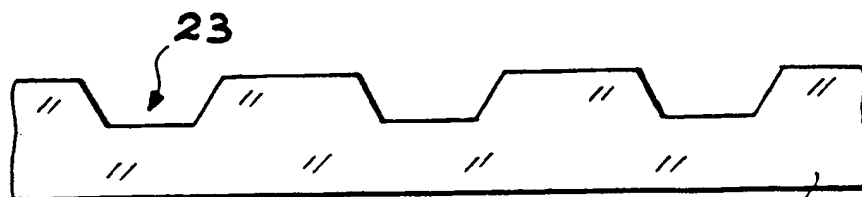


FIG. 8 B

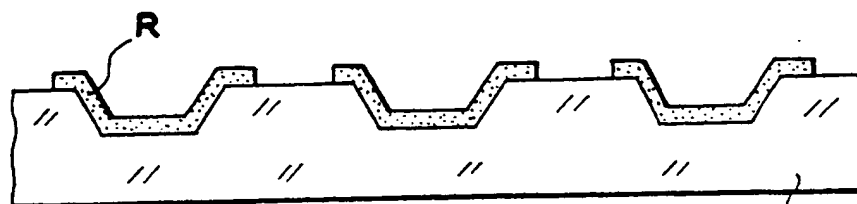


FIG. 8 C

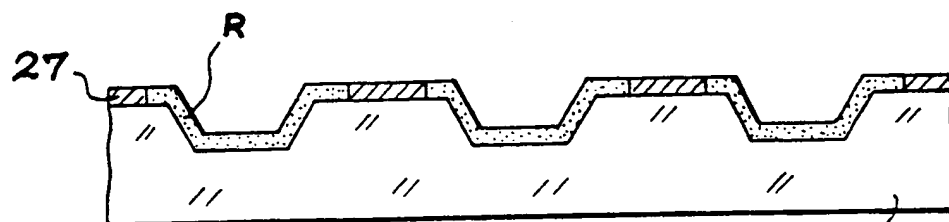


FIG. 8 D

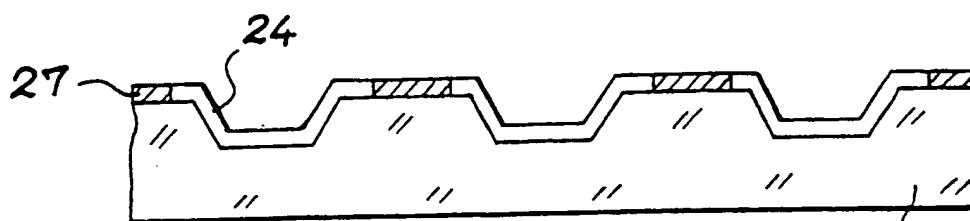


FIG. 8 E

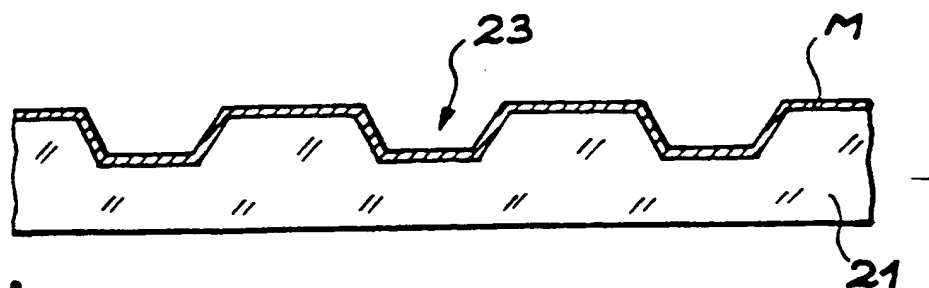


FIG. 9A

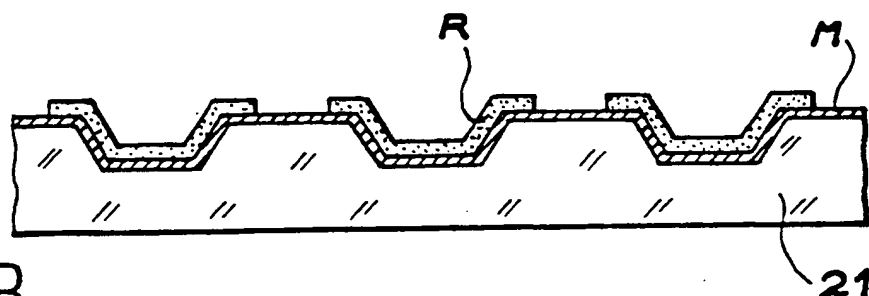


FIG. 9B

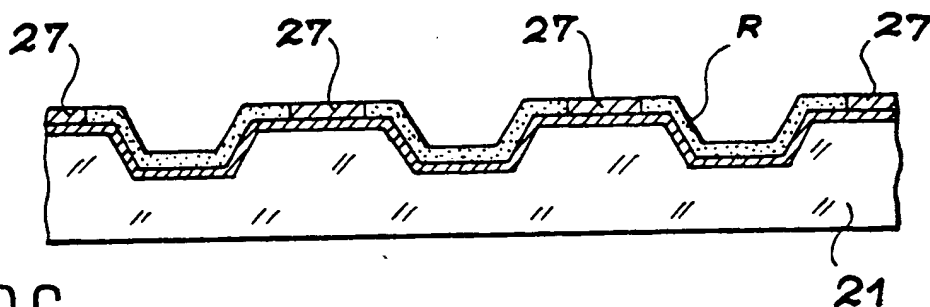


FIG. 9C

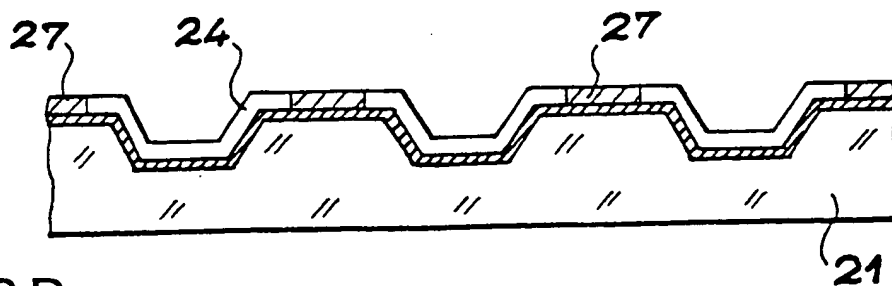


FIG. 9D

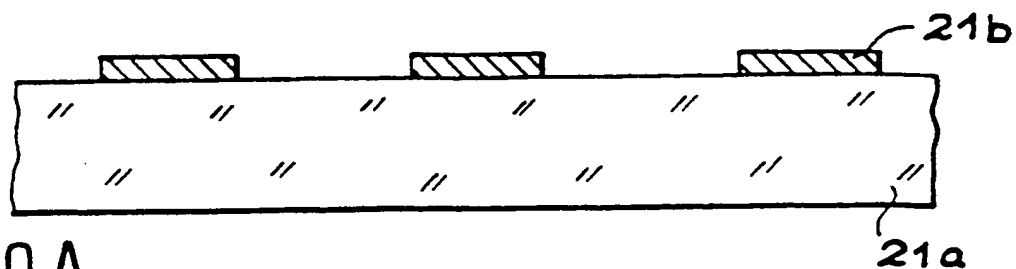


FIG. 10 A

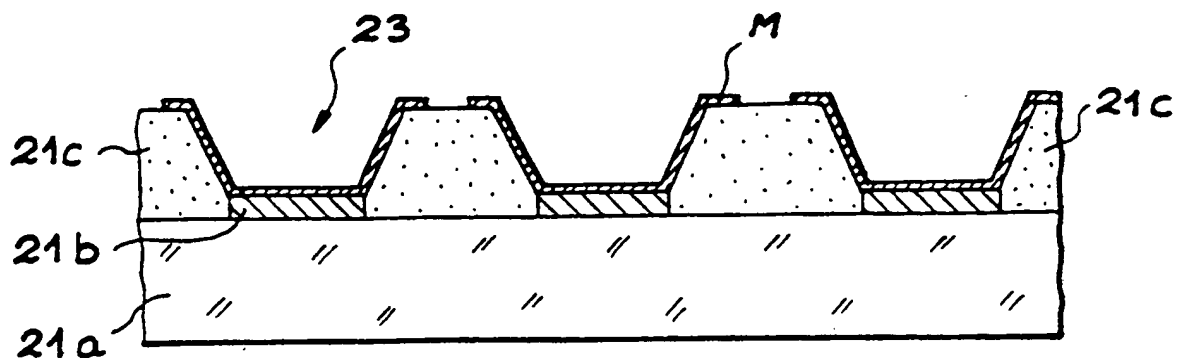


FIG. 10 B

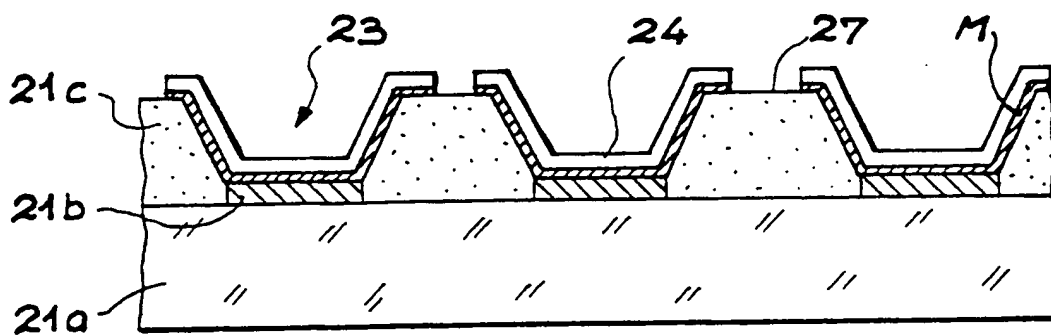


FIG. 10 C

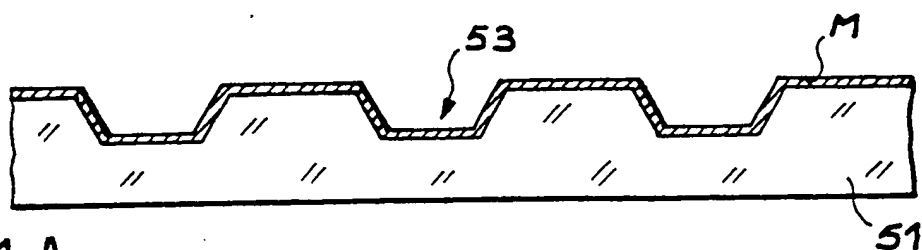


FIG. 11 A

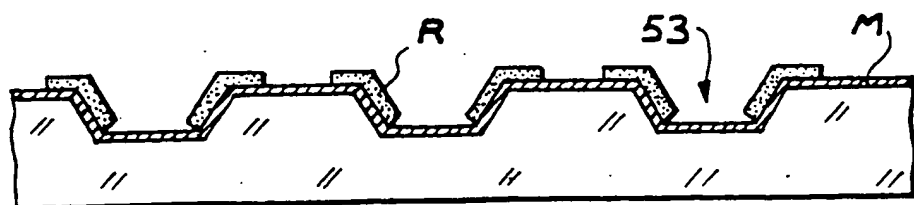


FIG. 11 R

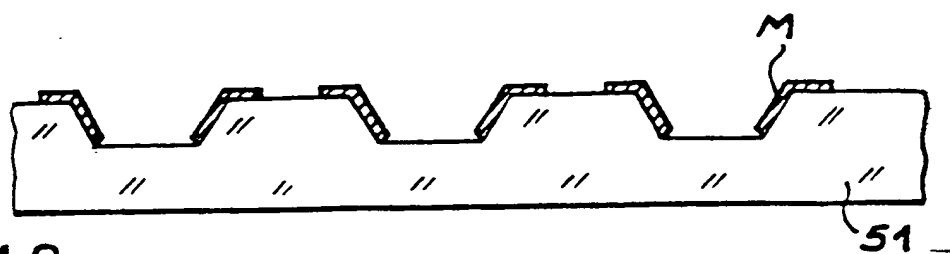


FIG. 11 C

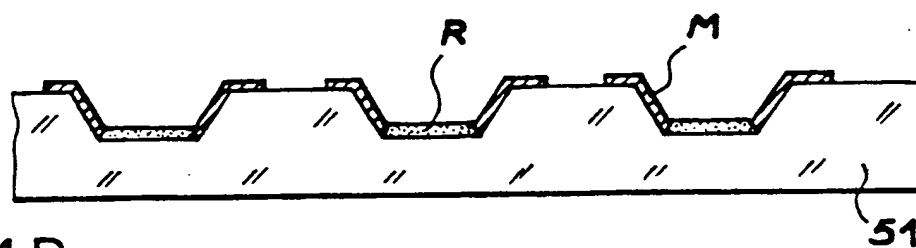


FIG. 11 D

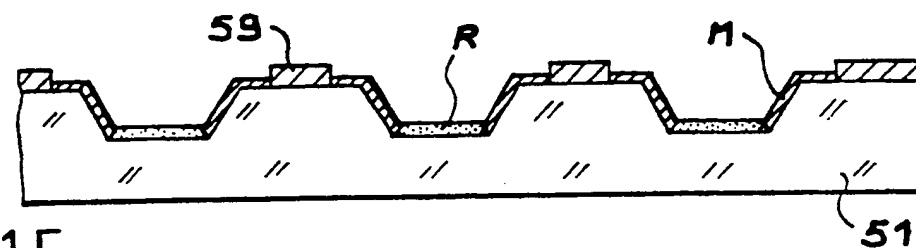


FIG. 11 E

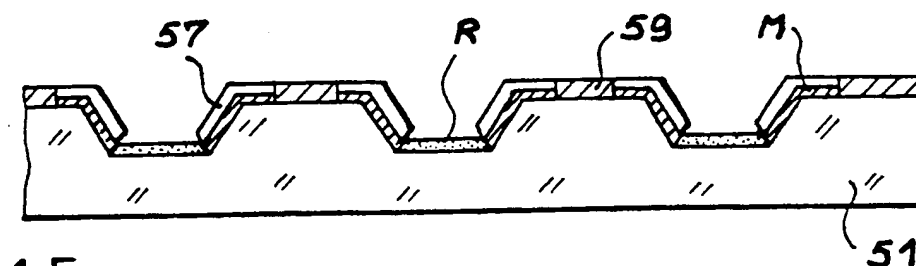


FIG. 11 F

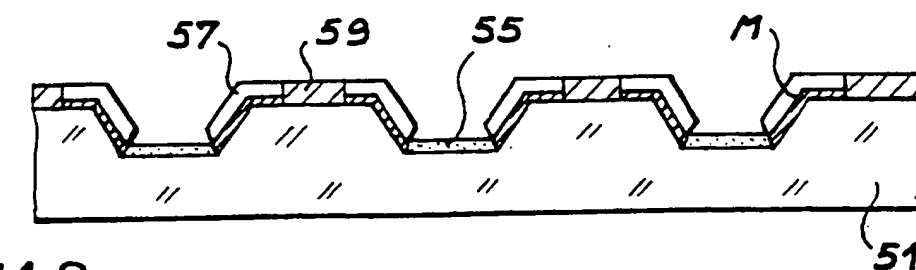


FIG. 11 G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/02191

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N27/327 G01N33/543 C12Q1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 474 796 A (BRENNAN THOMAS M) 12 December 1995 (1995-12-12) cited in the application the whole document ---	1,10-12
X	US 5 653 939 A (KOSICKI BERNARD B ET AL) 5 August 1997 (1997-08-05) the whole document ---	1,10-12
A	WO 96 28538 A (MESO SCALE TECHNOLOGIES LLC) 19 September 1996 (1996-09-19) examples --- -/--	1,10-12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 November 1999

Date of mailing of the international search report

25/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No
PCT/TR 99/02191

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JACKMAN R J ET AL: "FABRICATING LARGE ARRAYS OF MICROWELLS WITH ARBITRARY DIMENSIONS AND FILLING THEM USING DISCONTINUOUS DEWETTING" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 70, no. 11, 1 June 1998 (1998-06-01), pages 2280-2287, XP000766188 the whole document -----</p>	<p>1,10-12</p> <p style="text-align: center;">—</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

.nation on patent family members

Application No

PCT/IN 99/02191

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5474796 A	12-12-1995	AT 156034 T	15-08-1997
		CA 2163781 A	08-12-1994
		DE 69404657 D	04-09-1997
		DE 69404657 T	18-12-1997
		EP 0703825 A	03-04-1996
		JP 9500568 T	21-01-1997
		WO 9427719 A	08-12-1994
US 5653939 A	05-08-1997	US 5846708 A	08-12-1998
		EP 0638173 A	15-02-1995
		JP 7508831 T	28-09-1995
		WO 9322678 A	11-11-1993
		AT 176324 T	15-02-1999
		DE 69228291 D	11-03-1999
		DE 69228291 T	02-06-1999
		EP 0543550 A	26-05-1993
		JP 5322817 A	07-12-1993
		US 5532128 A	02-07-1996
		US 5670322 A	23-09-1997
		US 5891630 A	06-04-1998
WO 9628538 A	19-09-1996	AU 5420596 A	02-10-1996
		BR 9607193 A	11-11-1997
		CA 2213854 A	19-09-1996
		CN 1186513 A	01-07-1998
		CZ 9702844 A	14-10-1998
		EP 0821726 A	04-02-1998
		HU 9801679 A	28-10-1998
		JP 11502617 T	02-03-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

and Internationale No

PCT/TK 99/02191

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 G01N27/327 G01N33/543 C12Q1/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 474 796 A (BRENNAN THOMAS M) 12 décembre 1995 (1995-12-12) cité dans la demande le document en entier ---	1, 10-12
X	US 5 653 939 A (KOSICKI BERNARD B ET AL) 5 août 1997 (1997-08-05) le document en entier ---	1, 10-12
A	WO 96 28538 A (MESO SCALE TECHNOLOGIES LLC) 19 septembre 1996 (1996-09-19) exemples --- -/-	1, 10-12

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 novembre 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/11/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreno, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Internationale No
PCT/FR 99/02191

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>JACKMAN R J ET AL: "FABRICATING LARGE ARRAYS OF MICROWELLS WITH ARBITRARY DIMENSIONS AND FILLING THEM USING DISCONTINUOUS DEWETTING" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 70, no. 11, 1 juin 1998 (1998-06-01), pages 2280-2287, XP000766188 le document en entier</p> <p>-----</p>	1, 10-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Internationale No

PCT/TR 99/02191

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5474796 A	12-12-1995	AT 156034 T	15-08-1997
		CA 2163781 A	08-12-1994
		DE 69404657 D	04-09-1997
		DE 69404657 T	18-12-1997
		EP 0703825 A	03-04-1996
		JP 9500568 T	21-01-1997
		WO 9427719 A	08-12-1994
US 5653939 A	05-08-1997	US 5846708 A	08-12-1998
		EP 0638173 A	15-02-1995
		JP 7508831 T	28-09-1995
		WO 9322678 A	11-11-1993
		AT 176324 T	15-02-1999
		DE 69228291 D	11-03-1999
		DE 69228291 T	02-06-1999
		EP 0543550 A	26-05-1993
		JP 5322817 A	07-12-1993
		US 5532128 A	02-07-1996
		US 5670322 A	23-09-1997
		US 5891630 A	06-04-1998
WO 9628538 A	19-09-1996	AU 5420596 A	02-10-1996
		BR 9607193 A	11-11-1997
		CA 2213854 A	19-09-1996
		CN 1186513 A	01-07-1998
		CZ 9702844 A	14-10-1998
		EP 0821726 A	04-02-1998
		HU 9801679 A	28-10-1998
		JP 11502617 T	02-03-1999

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.